



PCT/FR2004/050315

REÇU 15 OCT. 2004

OMPI PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

10 JUIL 2003

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa  
N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 0 W / 030103

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>69 INPI LYON</b> LIEU <b>0308446</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>10 JUIL. 2003</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  bioMérieux Département de la Propriété Industrielle  Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif) STAPHAM</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries de genre Staphylococcus			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		6 7 3 6 2 0 3 9 9	
Code APE-NAF		1 1 1 1	
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	6 9 2 8 0 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.53.28 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		catherine.duret@eu.biomerieux.com	
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

16 JUIL 2003  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0308446  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom	DENJEAN		
Prénom	Frédérique		
Cabinet ou Société	bioMérieux		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG 10870		
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	16 9 12 18 10 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)	04.78.87.75.70		
N° de télécopie (facultatif)	04.78.87.21.16		
Adresse électronique (facultatif)	frédérique.denjean@eu.biomerieux.com		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. DIEZ	

La présente invention concerne la détection et/ou l'identification de bactéries de genre *Staphylococcus*.

Les bactéries de genre *Staphylococcus* ou Staphylocoques sont responsables d'un grand nombre d'infections nosocomiales et représentent un problème hospitalier important. Ces bactéries sont des bactéries Gram positives, qui peuvent être classées en deux grands groupes que l'on distingue par la production d'une enzyme, la coagulase, déclenchant la coagulation du plasma. On distingue ainsi les Staphylocoques coagulase négatifs, dont le représentant principal est *Staphylococcus epidermidis* et les Staphylocoques coagulase positifs, dont le représentant principal est *Staphylococcus aureus*, bien connu pour sa virulence. Les Staphylocoques sont largement répandus dans l'environnement, la peau et les muqueuses de l'homme et de l'animal. La desquamation régulière de ces hôtes a pour effet de les disperser abondamment dans la nature (eau, sol, air, aliments, objets), et en milieu hospitalier, des mesures draconiennes d'hygiène et d'isolement des patients sont requises pour limiter la dissémination des souches épidermiques. Ainsi, *Staphylococcus aureus*, qui représente 80 à 90% des Staphylocoques isolés en clinique est un pathogène majeur de l'homme responsable de nombreuses infections en milieu hospitalier, tels que notamment lors de pneumonies nosocomiales, d'infections de plaies chirurgicales, d'infections de brûlures, d'infections des corps étrangers (valves cardiaques, prothèses de hanche, agrafes...) et d'infections systémiques ou de septicémies qui sont souvent dues à l'usage de cathéters intra vasculaires, ou à la dissémination de la bactérie à partir d'un autre foyer infectieux. D'autres Staphylocoques font naturellement partie de la flore cutanéomuqueuse de l'homme comme *Staphylococcus epidermidis*, mais possèdent également un potentiel pathogène, qui s'exprime alors dans un contexte particulier: implantation de corps étrangers (prothèse cardiaque, sondes, cathéters...) et/ou immunodéficience (sida, radiothérapie, chimiothérapie, néonatalité...).

Il s'avère ainsi que n'importe quel Staphylocoque siégeant de façon permanente sur la peau et les muqueuses de l'homme présente un risque infectieux. Un diagnostic précoce de la présence de ces bactéries, ainsi que leur identification s'avère donc essentiel.

Un premier examen microscopique permet, rapidement, de part la morphologie des bactéries Gram positive très évocatrice, de suspecter la présence de Staphylocoques dans un échantillon biologique, tel qu'un échantillon sanguin ou un échantillon issu d'une plaie infectée.

5 Si cet examen microscopique montre la présence de bactéries Gram positive, un examen plus approfondi doit être réalisé, afin d'une part, de confirmer que ces bactéries appartiennent bien au genre *Staphylococcus*, et s'assurer qu'il ne s'agit pas de bactéries Gram positive d'autres genre telles que des bactéries de genre *Micrococcus* et d'autre part d'identifier l'espèce à laquelle appartiennent ces  
10 bactéries (*Staphylococcus epidermis*, *aureus*...). Pour cela, on met en culture ces bactéries (sur milieu standard et milieu sélectif de Chapman ) et on réalise :

- un diagnostic du genre auquel appartiennent ces bactéries. Ce diagnostic de genre peut être réalisé par un test de sensibilité à la lysostaphine, au lysozyme ou à la nitrofurantoïne,
- 15 • un diagnostic de l'espèce à laquelle appartiennent ces bactéries qui peut être réalisé notamment par des galeries d'identification.

Les techniques de biologie moléculaire sont également utilisées pour le diagnostic de genre et d'espèce, et permettent d'établir un diagnostic rapidement. Le principe de fonctionnement de ces techniques repose principalement sur un des fondements de la  
20 biologie moléculaire : le phénomène d'hybridation (voir par exemple A.C. Whelen et D. Persing, Annu. Rev. Microbiol., 1996, 50, p 349-373 ; J. M. Hunt et D. H. Persing, « Bacteria detection » in DNA Probes, ed GH Keller and MM Macrak, Stockton Press, 2<sup>nd</sup> edition, Section 13, p525-55).

Le diagnostic de l'espèce et/ou de genre peut être déterminé par l'utilisation de  
25 sondes d'hybridation. Lorsqu'on compare le génome des différentes espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*, on peut distinguer des régions dites conservées, dont la séquence est identique entre les différentes espèces de bactéries de genre *Staphylococcus* (on parlera par la suite de « séquence cible conservée »), et des régions dites spécifiques, dont la séquence est variable entre les différentes espèces  
30 de bactéries de genre *Staphylococcus* et caractéristique de chaque espèce (on parlera par la suite de « séquence cible spécifique »). Lorsqu'on souhaite réaliser un

diagnostic d'espèce, on choisit une sonde d'hybridation, spécifique d'une espèce donnée, qui s'hybride par complémentarité à une séquence cible spécifique. Lorsqu'on souhaite réaliser un diagnostic de genre, on choisit une sonde d'hybridation spécifique de genre *Staphylococcus*, qui s'hybride, par complémentarité à une séquence cible conservée. Ces techniques de biologie moléculaire faisant appel à des sondes d'hybridation sont bien connues de l'homme du métier qui peut se référer notamment à un ouvrage de base tel que « Molecular cloning, a laboratory manual », voir notamment Chapitre 9 : « analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA » et paragraphe 9.47 : « Hybridization of radiolabeled probes to immobilized nucleic acids »; J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis, (eds Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Toutefois, la quantité de bactéries étant généralement trop faible dans la plupart des prélèvements cliniques, il est souvent nécessaire d'augmenter, par une réaction d'amplification enzymatique, la quantité de séquences cibles (conservées ou spécifiques) susceptibles de s'hybrider à une sonde d'hybridation, afin d'augmenter la probabilité d'hybridation entre cette séquence cible et cette sonde d'hybridation. De telles techniques sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159.

Pour le diagnostic de bactéries de genre *Staphylococcus*, cette étape d'amplification est délicate car, ne connaissant ni l'espèce, ni le genre de bactéries susceptible de contaminer l'échantillon, on doit utiliser des amorces d'amplification permettant d'amplifier des séquences cibles uniquement de bactéries de genre *Staphylococcus*, mais ceci, quelque soit l'espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*. De plus, du fait de la grande variabilité du génome entre les différentes espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*, une amorce d'amplification conforme à la séquence connue d'une espèce de genre *Staphylococcus* peut faillir à l'amplification d'une autre espèce de genre *Staphylococcus*. Le choix des amorces d'amplification est donc essentiel.

La présente invention fournit précisément de nouvelles amorces d'amplification facilitant la détection et/ou l'identification d'un grand nombre d'espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*.

D'une manière surprenante, les inventeurs ont découvert que les amorces d'amplification comprenant la SEQ ID N°1 (5' TAA CCT ACC TAT AAG ACTG G 3') ou la SEQ ID N°2 (5' TC ACC CCA ATC ATT TGT CCC 3') sont très pertinentes pour amplifier des séquences cibles permettant non seulement de détecter des bactéries de genre *Staphylococcus*, mais également d'identifier un grand nombre d'espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*.

A ce titre, l'invention concerne un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries de genre *Staphylococcus* dans un échantillon biologique comprenant les étapes suivantes :

A. on extrait le matériel nucléaire des bactéries de genre *Staphylococcus*,

B. on amplifie au moins une séquence cible du matériel nucléaire des bactéries de genre *Staphylococcus* grâce à au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2 pour obtenir des amplicons de la séquence cible.

C. on détermine la présence de bactéries de genre *Staphylococcus* par la détection desdits amplicons.

Au sens de la présente invention, les bactéries de genre *Staphylococcus* peuvent être notamment des bactéries *Staphylococcus arlettae* ; *Staphylococcus aureus.aureus* ; *Staphylococcus auricularis* ; *Staphylococcus capitis.capitis* ; *Staphylococcus capitis.ureolyticus* ; *Staphylococcus caprae* ; *Staphylococcus carnosus carnosus* ; *Staphylococcus carnosus utilis* ; *Staphylococcus chromogenes* ; *Staphylococcus cohnii cohnii* ; *Staphylococcus cohnii urealyticum* ; *Staphylococcus condimenti* ;

*Staphylococcus delphini* ; *Staphylococcus epidermidis* ; *Staphylococcus equorum* ;  
*Staphylococcus gallinarum* ; *Staphylococcus haemolyticus* ; *Staphylococcus*  
*hominis.hominis* ; *Staphylococcus hominis.novobiosepticus* ; *Staphylococcus hyicus*  
 ; *Staphylococcus intermedius* ; *Staphylococcus kloosii* ; *Staphylococcus lentus* ;  
 5 *Staphylococcus lugdunensis* ; *Staphylococcus pasteuri* ; *Staphylococcus*  
*piscifermentans* ; *Staphylococcus pulvereri* ; *Staphylococcus saprophyticus.bovis* ;  
*Staphylococcus saprophyticus.saprophyticus* ; *Staphylococcus schleiferi.coagulans* ;  
*Staphylococcus schleiferi.schleiferi* ; *Staphylococcus sciuri* ; *Staphylococcus*  
*simulans* ; *Staphylococcus vitulinus* ; *Staphylococcus warneri* ; *Staphylococcus*  
 10 *xylosus*

Au sens de la présente invention, on entend par échantillon biologique, tout  
 échantillon susceptible de contenir un matériel nucléique tel que défini ci après. Cet  
 échantillon biologique peut être prélevé chez un patient et peut être notamment un  
 échantillon de tissus infectés, de prélèvements nasaux, de sang, de sérum, de salive,  
 15 de cellules circulantes du patient. On dispose de cet échantillon biologique par tout  
 type de prélèvement connu de l'homme du métier. Cet échantillon biologique peut  
 également être un échantillon alimentaire, d'eau, de lait, aliment d'origine animale,  
 prélèvements vétérinaires (tissus infectés...).

Au sens de la présente invention, le matériel nucléique comprend une séquence  
 20 d'acides nucléiques telle que séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou  
 d'acides ribonucléiques (ARN). Par séquence d'acides nucléiques (ou fragment  
 nucléotidique ou oligonucléotide, ou polynucléotide), on entend un enchaînement de  
 motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique,  
 caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels,  
 25 susceptibles de s'hybrider à une autre séquence d'acides nucléiques, l'enchaînement  
 pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir  
 d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou  
 par synthèse chimique. Par motif nucléique, on entend un dérivé d'un monomère qui  
 peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont  
 30 un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ADN le sucre est le  
 désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou



l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléique comprend une séquence d'acides désoxyribonucléiques.

Cette séquence d'acides nucléiques comprend au moins une séquence cible. Par séquence cible, on entend une séquence dont l'enchaînement en motifs nucléotidiques permet de déterminer la présence d'une bactérie de genre *Staphylococcus* et/ou d'identifier l'espèce de bactérie de genre *Staphylococcus*. Cette séquence cible comprend au moins une séquence cible conservée, c'est à dire une séquence dont l'enchaînement en motifs nucléotidiques permet de déterminer la présence de n'importe quelle espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*. La séquence cible peut comprendre, en outre, au moins une séquence cible spécifique, c'est à dire une séquence dont l'enchaînement en motifs nucléotidiques permet d'identifier une espèce donnée de bactérie de genre *Staphylococcus*. Selon un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, la séquence cible spécifique est comprise entre deux séquences cibles conservées.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléique est extrait d'un échantillon biologique prélevé chez un patient.

Au sens de la présente invention, on entend par amorce d'amplification, une séquence nucléique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques, préférentiellement de 15 à 25 motifs nucléotidiques permettant l'initiation d'une polymérisation enzymatique, telle que notamment une réaction d'amplification enzymatique. Cette

amorce d'amplification comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 ou au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2. Au sens de la présente invention, une amorce d'amplification

5

- une séquence homologue à la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2, c'est à dire
  - la séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire de la SEQ ID N°1 ou 2
  - une séquence présentant une homologie suffisante pour s'hybrider à la SEQ ID N°1 ou à la SEQ ID °2 ou à la séquence complémentaire à la SEQ ID N°1 ou à la SEQ ID N°2,

10

- une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 (ou une séquence homologue à SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases

15

thymine,

et qui aurait la même fonction que l'amorce d'amplification selon l'invention, c'est à dire permettre l'amplification d'un grand nombre d'espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*, est considérée comme équivalente à l'amorce d'amplification selon l'invention.

20

Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies (ou amplicons) d'une séquence nucléique par l'action d'au moins une enzyme. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159 ; la

25

LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184 ; la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069 ; la 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995 ; la NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, ou encore la TMA (Transcription

30

Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491. Dans la suite de l'exposé, on parlera de séquence cible qu'elle soit en simple brin ou en double brin.

Lors de l'étape A, on extrait le matériel nucléique par tout protocole connu de l'homme du métier. A titre indicatif, l'extraction d'acides nucléique peut être réalisée par une étape de lyse des cellules présentes dans l'échantillon biologique, afin de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet WO00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique, WO99/53304 sur la lyse électrique, et WO99/15321 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US 5,234,809). Cette étape de lyse peut également être suivie d'une étape de purification, permettant la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques, et peut être adapté à la purification d'ADN ou d'ARN. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US 4,672,040 et US 5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO97/45202 et WO99/35500. Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne, soit sous forme de particules inertes (Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503) ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Une autre

méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

Lorsque l'on souhaite extraire spécifiquement l'ADN d'un échantillon biologique, on peut notamment réaliser une extraction par du phénol, du chloroforme et de l'alcool pour éliminer les protéines et précipiter l'ADN avec de l'alcool 100%. L'ADN peut alors être culoté par centrifugation, lavé et remis en suspension.

Lors de l'étape B, on amplifie au moins une séquence cible du matériel nucléique par l'une quelconque des réactions d'amplification enzymatique telles que définies précédemment. Ces techniques mettent généralement une succession de cycle comprenant les étapes suivantes :

- la dénaturation de la séquence cible si celle ci est en double brin afin d'obtenir deux brins cibles, complémentaires,
- l'hybridation de chacun des brins cibles, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente avec au moins une amorce d'amplification ,
- la formation à partir des amorces d'amplification des brins complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'une enzyme polymérase et de nucléosides triphosphate (ribonucléoside triphosphate et/ou desoxyribonucléoside triphosphate selon les techniques)

ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir la séquence cible dans une proportion suffisante pour permettre sa détection.

Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux séquences nucléiques telle que notamment une amorce d'amplification et une séquence cible ou une sonde d'hybridation et une séquence cible, se lient avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques pour former un double brin. Ces liaisons hydrogènes se forment entre les bases complémentaires Adénine (A) et thymine (T) (ou uracile (U)) (on parle de liaison A-T) ou entre les bases complémentaires Guanine (G) et cytosine (C) (on parle de liaison G-C). L'hybridation de deux séquences nucléiques peut être totale (on parle alors de séquences complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu lors de cette hybridation comprend uniquement des liaisons A-T et des liaisons C-G. Cette hybridation peut être partielle (on parle alors de séquences suffisamment

complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu comprend des liaisons A-T et des liaisons C-G permettant de former le double brin, mais également des bases non liées à une base complémentaire. L'hybridation entre deux séquences complémentaires ou suffisamment complémentaires dépend des conditions opératoires qui sont utilisées, et notamment de la stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases des deux séquences nucléiques, ainsi que par le degré de mésappariement entre ces deux séquences nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier. En général, selon la longueur des séquences nucléiques que l'on souhaite hybrider, la température d'hybridation est comprise entre environ 20 et 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M. Lors de l'étape d'hybridation, l'amorce d'amplification selon l'invention s'hybride préférentiellement sur une séquence cible conservée.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on amplifie au moins une séquence cible par PCR. Cette réaction d'amplification peut être réalisée par l'hybridation de deux amorces d'amplification qui s'hybrident à chaque extrémité de la séquence cible que l'on souhaite amplifier. Préférentiellement, chaque amorce d'amplification s'hybride sur une séquence cible conservée. A titre indicatif, lorsqu'on utilise une amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et une amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2, on amplifie une séquence cible d'une taille de 1375 paires de base. Cette séquence cible correspondrait par exemple à la séquence 128-1503 du génome de *Staphylococcus aureus* (référence Genbank X68417).

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, lorsqu'on utilise une amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et une amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2 en

PCR, chaque cycle de la réaction d'amplification enzymatique comprend les étapes suivantes :

- 5      ○ la dénaturation de la séquence cible si celle ci est en double brin (et/ou la dénaturation de la séquence cible et de l'amplicon à partir du 2<sup>ème</sup> cycle), réalisée préférentiellement à une température comprise entre 90 et 99°C, et encore plus préférentiellement entre 94 et 95 °C, pour une durée préférentiellement comprise entre 20 et 40 secondes, et encore plus préférentiellement pour une durée comprise entre 25 et 35 secondes
- 10     ○ l'hybridation de chacun des brins cibles, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente avec au moins une amorce d'amplification, réalisée préférentiellement à une température comprise entre 50 et 60 °C, et encore plus préférentiellement entre 53 et 57 °C, pour une durée préférentiellement comprise entre 20 et 40 secondes, et encore plus préférentiellement pour une durée comprise entre 25 et 35 secondes
- 15     ○ la formation à partir des amorces d'amplification de copies de la séquence cible (ou amplicons), réalisée préférentiellement à une température comprise entre 65 et 80°C, et encore plus préférentiellement entre 70 et 74 °C, pour une durée préférentiellement comprise entre 45 et 75 secondes, et encore plus préférentiellement pour une durée comprise entre 55 et 65 secondes
- 20     ce cycle étant répété préférentiellement de 25 à 35 fois, et encore plus préférentiellement 30 fois.

Au sens de la présente invention, on entend par amplicons les copies de la séquence cible obtenues lors d'une réaction d'amplification enzymatique.

25     La détection des amplicons lors de l'étape C, peut être réalisée par tous les protocoles connus de l'homme du métier concernant la détection d'acides nucléiques. A titre indicatif, cette détection peut être réalisée après migration par électrophorèse des amplicons qui migre en fonction de leur taille. Le gel et le milieu de migration peuvent comprendre du bromure d'éthidium afin de permettre la détection directe des amplicons lorsque le gel est placé, après un temps de migration  
30     donné, sur une table lumineuse à rayons UV (ultra violet) par l'émission d'un signal lumineux. Ces techniques d'électrophorèse sont bien connus de l'homme du métier.

Les amplicons peuvent également être détectés et quantifiés par l'utilisation d'une gamme de quantification obtenue par une réaction d'amplification conduite jusqu'à saturation.

On peut également utiliser des sondes d'hybridation pour détecter la présence des amplicons. Au sens de la présente invention, on entend par sonde d'hybridation, une séquence nucléique de 5 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 15 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec une séquence nucléique cible. La sonde d'hybridation peut comprendre un marqueur permettant sa détection.

On parle alors de sondes de détection. Par détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une détection indirecte par une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249]. Par marqueur, on entend un traceur capable d'engendrer un signal que l'on peut détecter. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêta galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé tel que défini ci dessus comprend en outre l'étape suivante :

D. on identifie l'espèce de bactéries de genre *Staphylococcus* par l'utilisation d'au moins une sonde d'hybridation capable de s'hybrider sur une séquence cible spécifique d'une espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*.

5 Par sonde d'hybridation capable de s'hybrider sur une séquence cible spécifique d'une espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*, on entend une sonde d'hybridation telle que définie précédemment, qui comprend au moins une séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire à une séquence cible spécifique d'une espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*. Au sens de la présente invention,  
10 la sonde d'hybridation peut être une sonde dite de détection. Dans ce cas, la sonde dite de détection est marquée au moyen d'un marqueur tel que défini précédemment. Grâce à la présence de ce marqueur, on peut détecter la présence d'une réaction d'hybridation entre une sonde de détection donnée et la séquence cible spécifique d'une espèce donnée. La présence d'une telle réaction d'hybridation permet ainsi  
15 d'identifier une espèce donnée de bactéries de genre *Staphylococcus*. La sonde d'hybridation peut être également une sonde dite de capture. Dans ce cas, la sonde dite de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption. On détecte alors la réaction d'hybridation entre une sonde  
20 de capture donnée et une séquence cible spécifique de l'espèce donnée ce qui permet d'identifier l'espèce bactérienne. Pour la détection de la réaction d'hybridation, on utilise préférentiellement des séquences cibles marquées, directement (notamment par l'incorporation d'un marqueur au sein de la séquence cible) ou indirectement (notamment par l'utilisation d'une sonde de détection telle que définie  
25 précédemment) la séquence cible. On peut notamment réaliser avant l'étape d'hybridation une étape de marquage et/ou de clivage de la séquence cible, par exemple en utilisant un désoxyribonucléotide triphosphate marqué lors de la réaction d'amplification enzymatique. Le clivage peut être réalisé notamment par l'action de l'imidazole et de chlorure de manganèse. La séquence cible peut aussi être marqué  
30 après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde de détection selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO 91/19812. Un



autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR2 780 059.

Comme support solide, on peut utiliser des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, notamment les polysaccharides  
 5 tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ;  
 10 des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO 94/12670, d'une particule. On peut également immobiliser sur le support plusieurs sondes de capture différentes, chacune étant spécifique d'une espèce de bactéries de genre *Staphylococcus*. Selon un mode  
 15 préféré de réalisation de l'invention, on utilise comme support une biopuce sur laquelle sont immobilisées un grand nombre de sondes de capture différentes. Par biopuce, on entend un support solide de dimension réduite où sont fixée une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées. Le concept de biopuce, ou puce à ADN, date du début des années 90 et repose sur une technologie  
 20 pluridisciplinaire intégrant la micro-électronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'images et l'informatique. On peut citer à titre indicatif, les puces à ADN mises au point par la société Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Chee et al., Science, 1996, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis", A. Caviani  
 25 Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026), pour les diagnostics moléculaires. D'autres exemples de biopuces sont donnés dans les publications de G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng  
 30 et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546 ou dans les brevets US 4,981,783, US 5,700,637, US 5,445,934, US 5,744,305 et US 5,807,522. La

caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les séquences cible tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. La méthode des biopuces repose sur l'emploi de sondes de capture fixées sur un support solide sur lesquelles on fait agir des séquences nucléiques cibles marqués directement ou indirectement avec par exemple des fluorochromes. Les sondes de capture sont positionnées de manière spécifique sur le support ou puce et chaque hybridation donne une information particulière, en relation avec la séquence nucléique cible. Après hybridation, le support ou puce est lavé(e), et la réaction d'hybridation entre une séquence nucléique cible marquée et une sonde de capture peut être détecté par l'utilisation d'un ligand de forte affinité lié par exemple à un marqueur de type fluorochrome. La fluorescence est lue par exemple par un scanner et l'analyse de la fluorescence est traitée par informatique. La présence d'une réaction d'hybridation entre une sonde de capture donnée et une séquence cible spécifique d'une espèce donnée permet ainsi d'identifier l'espèce donnée de bactéries de genre *Staphylococcus*.

L'invention concerne également une amorce d'amplification caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et une amorce d'amplification caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

Préférentiellement, l'amorce d'amplification selon l'invention comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 en encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques contigus de la SEQ ID N°1 ou au moins 10, préférentiellement au moins 15 en encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques contigus de la SEQ ID N°2.

Au sens de la présente invention, une amorce d'amplification comprenant

- une séquence homologue à la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2, c'est à dire,
  - la séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire de la SEQ ID N°1 ou 2

- une séquence présentant 80 % d'homologie avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2,
  - une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 (ou une séquence homologue à SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases thymine, ou dans laquelle au moins une base est substituée par une base universelle telle que l'inosine,
- et qui aurait la même fonction que l'amorce d'amplification selon l'invention, c'est à dire permettre l'amplification d'un grand nombre d'espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*, est considérée comme équivalente à l'amorce d'amplification selon l'invention.
- L'invention concerne également une paire d'amorces d'amplification caractérisé en ce qu'elle comprend une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2. Cette paire d'amorce est préférentiellement utilisée dans une réaction d'amplification enzymatique telle que la PCR.
- L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une amorce comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2 pour la détection et/ou l'identification de bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*.
- L'invention concerne enfin un kit de diagnostic de bactéries de genre *Staphylococcus* comprenant au moins une amorce comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une amorce comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

L'invention concerne également une sonde d'hybridation caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et une  
 5 sonde d'hybridation caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

Préférentiellement, la sonde d'hybridation selon l'invention comprend au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs  
 10 nucléotidiques contigus de la SEQ ID N°1 ou au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques contigus de la SEQ ID N°2.

Au sens de la présente invention, une sonde d'hybridation comprenant

- une séquence homologue à la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2, c'est à dire,
  - 15     o la séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire de la SEQ ID N°1 ou 2
  - o une séquence présentant 80 % d'homologie avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2,
- une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 (ou  
 20     une séquence homologue à SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases thymine, ou dans laquelle au moins une base est substituée par une base universelle telle que l'inosine,

et qui aurait la même fonction que la sonde d'hybridation selon l'invention, c'est à  
 25 dire permettre la détection d'un grand nombre d'espèces de bactéries de genre *Staphylococcus*, est considérée comme équivalente à la sonde d'hybridation selon l'invention.

La sonde d'hybridation selon l'invention peut être une sonde de détection ou une sonde de capture telles que définies précédemment.

30 L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus

préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2 pour la détection et/ou l'identification de bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*.

L'invention concerne également un kit de diagnostic de bactéries de genre *Staphylococcus* comprenant au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

L'invention concerne enfin une composition pour la détection de bactéries de genre *Staphylococcus* comprenant au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une sonde d'hybridation comprenant au moins 10, préférentiellement au moins 15 et encore plus préférentiellement au moins 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

La figure suivante est donnée à titre illustratif et n'a aucun caractère limitatif. Elle permettra de mieux comprendre l'invention.

La figure 1 présente une photographie d'un gel d'électrophorèse tel qu'obtenu après migration de différents amplicons obtenus selon l'exemple ci après, déposés dans les puits 1 à 15. Les amplicons provenaient de différentes espèces de bactéries de genre *Staphylococcus* (puits 1 : Puits 1: *Staphylococcus cohnii* ssp *cohnii*; Puits 2: *Staphylococcus cohnii* ssp *urealyticum*; Puits 3: *Staphylococcus intermedius*; Puits 4 : *Staphylococcus xylosus*; Puits 5 : *Staphylococcus pasteurii*) et d'espèces de bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* (Puits 6: *Streptococcus pneumoniae*; Puits 7: *Klebsiella pneumoniae*; Puits 8: *Pseudomonas aeruginosa*; Puits 9 : *Enterococcus faecalis*; Puits 10: *Enterobacter cloacae*; Puits 11: *Proteus mirabilis*; Puits 12: *Streptococcus agalactiae*; Puits 13: *Citrobacter freundii*; Puits 14 : *Salmonella enteritidis*; Puits 15: *Stenotrophomonas maltophilia*). La bonne taille des amplicons a été vérifiée par la migration simultanée d'un marqueur de taille (puits

5 M). La présence de bactérie de genre *Staphylococcus* était confirmée par la présence d'une bande de la taille attendue, correspondant à un amplicon de 1,4kB environ (puits 1 à 5), alors qu'aucune bande n'était observée pour les bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* (puits 6 à 15). Le puits T(-) correspond à un tube témoin négatif.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

10 1/ Mise en culture de bactéries : 31 espèces de bactéries de genre *Staphylococcus* ainsi que 11 espèces de bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* (tableau 1) ont été mise en culture sur milieu gélosé trypticase-soja par une incubation à 37°C durant une nuit. Le n° de collection des espèces de bactéries mises en culture est indiqué dans le tableau 1 ci après (ATCC : American type culture collection ; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; CCM : Czech collection of  
15 microorganisms; CCUG : Culture collection, université de Göteborg, Suède).

**Tableau 1 – Genre et espèce de bactéries testées dans le procédé selon l'invention**

Genre	Espèce	n° collection
<i>Staphylococcus</i>	<i>arlettae</i>	ATCC43957
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus.aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus.aureus</i>	ATCC35844T
<i>Staphylococcus</i>	<i>auricularis</i>	ATCC33753T
<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis.capitis</i>	ATCC27840T
<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis.ureolyticus</i>	ATCC49325
<i>Staphylococcus</i>	<i>caprae</i>	ATCC35538T
<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus carnosus</i>	ATCC51365T
<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus utilis</i>	DSM11676T
<i>Staphylococcus</i>	<i>chromogenes</i>	ATCC43764T
<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii cohnii</i>	ATCC29974T
<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii urealyticum</i>	ATCC49330T
<i>Staphylococcus</i>	<i>condimenti</i>	DSM11674T
<i>Staphylococcus</i>	<i>delphini</i>	ATCC49171T
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	ATCC14990T
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum</i>	ATCC43958T
<i>Staphylococcus</i>	<i>gallinarum</i>	ATCC35539T
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	ATCC29970T
<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis.hominis</i>	ATCC27844T
<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis.novobiosepticus</i>	CCUG 42399T
<i>Staphylococcus</i>	<i>hyicus</i>	ATCC11249T
<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>	ATCC29663T
<i>Staphylococcus</i>	<i>kloosii</i>	ATCC43959T
<i>Staphylococcus</i>	<i>lentus</i>	ATCC29070T
<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdimensis</i>	ATCC43809T
<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	ATCC51129T
<i>Staphylococcus</i>	<i>piscifermentans</i>	ATCC51136T
<i>Staphylococcus</i>	<i>pulvereri</i>	ATCC51698T
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus.bovis</i>	CCM4410T
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus.saprophyticus</i>	ATCC15305T
<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi.coagulans</i>	CCUG37248T
<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi.schleiferi</i>	ATCC4308T
<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	ATCC 29062T
<i>Staphylococcus</i>	<i>simulans</i>	ATCC27848T
<i>Staphylococcus</i>	<i>vitulinus</i>	-
<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri *</i>	ATCC27836T
<i>Escherichia</i>	<i>xylosus</i>	ATCC 29971T
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	ATCC11775T
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC33400T
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC13883T
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC10145T
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	ATCC19433T
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	ATCC13047T
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC29906T
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	ATCC13813T
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	ATCC8090T
<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>	ATCC13076
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	ATCC13637T

Une suspension homogène à environ  $10^8$  CFU/ml dans de l'eau stérile a été préparée à partir des différentes colonies de bactéries cultivées, par un densitomètre bioMérieux (ref 99234). Les bactéries contenues dans un volume de 600 µl de cette suspension ont été lysées mécaniquement afin d'extraire leur matériel nucléaire.

5 L'amplification a été réalisée sur ce lysat de bactéries.

2) Amplification d'une séquence cible de bactéries de genre *Staphylococcus* par Polymérase Chain Réaction (PCR): l'amplification d'une séquence cible a été réalisée par PCR pour chaque souche bactérienne, par l'utilisation d'un kit Expand high fidelity de Roche (réf 11732650). Les PCR ont été effectuées à l'aide du kit  
10 Fast-Start™ (Roche Molecular Biochemicals). Chaque PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µl contenant du MgCl<sub>2</sub> (0,25mM), des deoxynucleotides triphosphate (0,25 mM Roche), 0,3 µM de l'amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 (5' TAACCTACCTATAAGACTGG 3') et 0,3 µM de l'amorce d'amplification comprenant 20 motifs nucléotidiques de la SEQ  
15 ID N°2 (5' TC ACC CCA ATC ATT TGT CCC 3') et 0,05 U du mélange de polymérases Expand high fidelity du kit afin d'obtenir un volume réactionnel final de 50µl.

Après 4 min à 95°C, 30 cycles de PCR ont été réalisés. Chaque cycle comprenait une étape de dénaturation (30 s à 95°C); une étape d'hybridation des amorces  
20 d'amplification sur la séquence cible (30 s à 55°C); une étape de formation des amplicons (1 min à 72°C). Une extension finale de 7 min à 72°C terminait la réaction d'amplification enzymatique.

3) Vérification de l'amplification: La qualité de l'amplification a été vérifiée sur gel 1,5% d'agarose dans du tampon TBE 0,5X, après coloration au bromure d'ethidium.  
25 La bonne taille des amplicons a été vérifiée par la migration simultanée d'un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec). La présence de bactérie de genre *Staphylococcus* était confirmée par la présence d'une bande de la taille attendue, correspondant à un amplicon de 1,4kB environ, alors qu'aucune bande n'était observée pour les bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus*.

30 4) Sensibilité des amorces d'amplification selon l'invention: la sensibilité des amorces a été testée sur de l'ADN génomique. Pour cela, une gamme d'ADN



génomique ( $2.10^7$ ;  $2.10^6$ ;  $2.10^5$ ;  $2.10^4$ ;  $2.10^3$ ;  $2.10^2$  et  $2.10^1$  copies /  $\mu$ l) été réalisée pour sensibilité des amorces et testé en PCR selon un protocole comparable à celui décrit dans le paragraphe 2) de l'exemple. Des amplicons étaient obtenus pour des concentrations d'ADN génomique supérieures ou égales à  $2.10^5$  copies/ $\mu$ l.

5 5) Spécificité des amorces : un amplicon d'environ 1400 paires de bases a été obtenu pour chacune des 39 espèces de bactéries de genre *Staphylococcus* alors qu'aucun amplicon n'a été généré pour les autres espèces de bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* montrant ainsi la très bonne spécificité des amorces selon l'invention, et plus particulièrement de la paire d'amorces selon l'invention. A titre  
10 indicatif, un exemple de gel d'électrophorèse obtenue après migration de différents amplicons provenant de différentes espèces de bactéries de genre *Staphylococcus* (*Staphylococcus cohnii* ssp *cohnii*; *Staphylococcus cohnii* ssp *urealyticum*; *Staphylococcus intermedius*; *Staphylococcus xylosus*; *Staphylococcus pasteurii*) et d'espèces de bactéries n'appartenant pas au genre *Staphylococcus* (*Streptococcus*  
15 *pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus faecalis*; *Enterobacter cloacae*; *Proteus mirabilis*; *Streptococcus agalactiae*; *Citrobacter freundii*; *Salmonella enteritidis*; *Stenotrophomonas maltophilia*) est présenté figure 1.

Le rendement d'amplification a été évaluée sur un bioanalyser 2100 d'Agilent. On  
20 obtenait un bon rendement d'amplification d'environ 18 ng /  $\mu$ l

## REVENDICATIONS

1. Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries de genre *Staphylococcus* d'un échantillon biologique comprenant les étapes suivantes :

5 A. on extrait le matériel nucléaire des bactéries de genre *Staphylococcus*,

B. on amplifie au moins une séquence cible du matériel nucléaire des bactéries de genre *Staphylococcus* grâce à au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1 et/ou au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2 pour obtenir des amplicons de la séquence cible

10 C. on détermine la présence de bactéries de genre *Staphylococcus* par la détection desdits amplicons.

15 2. Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* selon la revendication 1 comprenant en outre l'étape suivante :

20 D. on identifie l'espèce de bactéries de genre *Staphylococcus* par l'utilisation d'au moins une sonde d'hybridation capable de s'hybrider sur une séquence cible spécifique d'une espèce de bactérie de genre *Staphylococcus*.

25 3. Amorce d'amplification caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1.

4. Amorce d'amplification caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.

5. Paire d'amorces d'amplification caractérisé en ce qu'elle comprend l'amorce telle que définie dans la revendication 3 et l'amorce telle que définie dans la revendication 4.
- 5 6. Utilisation d'au moins une amorce telle que définie dans la revendication 3 et/ou au moins une amorce telle que définie dans la revendication 4 pour la détection et/ou l'identification de bactéries de genre *Staphylococcus*.
- 10 7. Kit de diagnostic de bactéries de genre *Staphylococcus* comprenant au moins une amorce telle que définie dans la revendication 3 et/ou au moins une amorce telle que définie dans la revendication 4.
- 15 8. Sonde d'hybridation caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°1
9. Sonde d'hybridation caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 motifs nucléotidiques de la SEQ ID N°2.
- 20 10. Composition pour la détection de bactéries de genre *Staphylococcus* comprenant au moins une sonde d'hybridation selon la revendication 8 et/ou au moins une sonde selon la revendication 9.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 T(e)

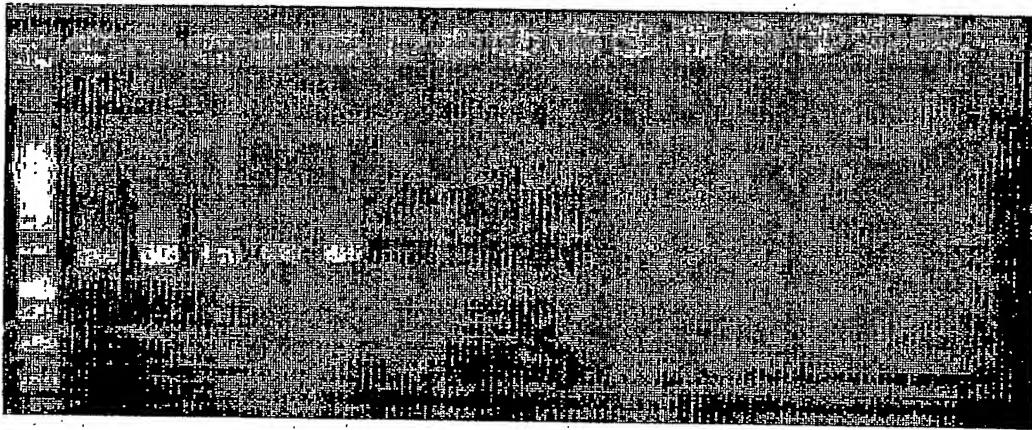


FIGURE 1

LISTAGE DES SEQUENCES

5      <110> BIOMERIEUX SA

         <120> Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries du  
genre Staphylococcus

10     <130> Unknown

         <160> 2

         <170> PatentIn version 3.1

15     <210> 1

         <211> 20

         <212> DNA

         <213> Staphylococcus sp.

20     <400> 1

         taacctacct ataagactgg

         20

25     <210> 2

         <211> 20

         <212> DNA

         <213> Staphylococcus sp.

30     <400> 2

         tcacccaat catttgcccc

         20

35



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire



09 113 0 W / 210103

**Vos références pour ce dossier (facultatif)**

STAPHAM

**N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL**

FR03/08446

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries de genre Staphylococcus

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

bioMérieux

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

<b>1</b>	Nom	TROESCH
	Prénoms	Alain
Adresse	Rue	4 rue des Primevères
	Code postal et ville	161917410 GENAS - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	LACROIX
	Prénoms	Bruno
Adresse	Rue	Chemin Montlouis
	Code postal et ville	1619121310 SAINT-GENIS LAVAL - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	JAY
	Prénoms	Corinne
Adresse	Rue	8 rue Curie
	Code postal et ville	1619131010 CALUIRE - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

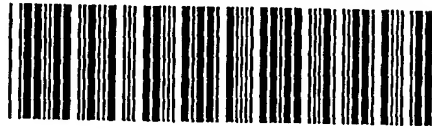
**DATE ET SIGNATURE(S)****DU (DES) DEMANDEUR(S)****OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

Marcy l'Etoile, le 21 octobre 2003

Frédérique DENJEAN  
Ingénieur Brevets

PCT/FR2004/050315



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**